

· 综述与专论 ·

东亚钳蝎蝎毒分离纯化及药理作用的研究进展

山东潍坊医学院天然药物研究所 (261042) 王燕平* 吕欣然

摘 要 蝎毒是一种具有多种生物活性的物质。我国主要为东亚钳蝎,综述了我国近 10 年有关蝎毒的不同毒性及活性组分的分离纯化及其药理作用的研究进展。

关键词 蝎毒 东亚钳蝎 分离纯化 药理作用

蝎毒是一种毒性仅次于蛇毒的生物毒素,因具有复杂的成分及性质而产生多种生理、药理活性。近年来,人们对蝎毒的生理、药理作用很感兴趣,有关其化学组成、分离纯化、分子结构、生理、药理作用等方面的报道陆续发表。蝎毒的种类很多,我国主要盛产东亚钳蝎,现将有关其分离纯化及其药理作用的研究进展综述如下:

1 蝎毒的生化性质

蝎毒主要由非蛋白和蛋白质两部分组成^[1]。非蛋白组分主要为脂类、有机酸及少量游离氨基酸。中国的东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch (BmK) 毒含有三甲胺、甜菜碱、牛磺酸、甘油酯、硬脂酸、铵盐等。蝎毒的主要活性部分是蛋白质,多为 20~80 个氨基酸组成的多肽,活性蛋白又因作用不同分为毒性蛋白和酶蛋白。蛋白质一般属碱性,等电点大于 8,分子量在 6 000~9 000 之间,但也有 3 000 左右或大于 10 000 的。蝎毒^[2]按作用机制可分为神经毒素和细胞毒素;按作用对象不同可分为哺乳动物毒素和昆虫毒素。蝎毒的结构中含有四对二硫键,其中三对构成环状的核心结构,对于保持稳定性以及发挥神经毒性有重要意义^[3]。蛇毒中也含有二硫键,但位置与蝎毒不同。一种蝎毒可分离出结构不同的多种毒素,蝎毒的成分如此复杂,因此,分离纯化对于研究蝎毒的性质和功能,进一步开发是绝对必要而有价值的。

2 东亚钳蝎毒性组分的分离纯化及性质

2.1 神经毒素的分离纯化:蝎毒的神经毒素主要是由于与细胞膜上钠离子通道结合后,影响神经信息传导而产生的毒性。蝎神经毒素按作用对象的不同可分为哺乳动物毒素、甲壳动物毒素及昆虫毒素。

2.1.1 哺乳动物神经毒素及甲壳动物毒素:周新

华^[4]最早将辽宁产的东亚钳蝎用 CM-Sephadex C-50 进行了离子交换层析,上柱量 50 mg,共得到 12 个组分。将毒性较强的第Ⅷ组分透析后再用重层析,又得到 4 个组分,再用 Sephadex G-50 凝胶过滤,纯化出两种毒素 I、II,分子量分别为 8 980 和 8 660,等电点分别为 7.58 和 7.90;为了得到更多组分,周新华等又用 2 g 蝎毒一次上样^[5],使得在小样品量柱层析中没被分离出的组分得以分离。分离纯化的程序为:先用 CM-Sephadex C-50 离子交换层析分离,再用 Sephadex G-50 过滤,最终纯化了 9 种毒素,与国外报道的前苏联的 *Buthus eupeus* 北非的 *B. occitunus tunetanus* 毒分离纯化结果相似,这 9 种毒素的分子量均在 7 200~8 800 之间 (BmK 4 例外,为 9 800)。吉永华等^[6]首先用 CM-Sephadex C-50 柱层析分离,0.01 mol/L NH_4HCO_3 溶液分五级洗脱,共分出 13 个峰,用 DEAE-Sephadex A-50 柱层析将毒性较强的 XI 峰分成两个峰,其中 XI-1 峰毒性较强;将 XI-1 和 XII 峰再次纯化,得到两个组分均为电泳纯,分别命名为马氏钳蝎神经毒素 I、II,分子量分别为 7 567 和 7 181。氨基酸组成含四对半胱氨酸,结构较稳定。其对小鼠的 LD_{50} 分别为 0.48 和 0.63 mg/mg,二者对甲壳动物也有较强的毒性。毒素 I 对昆虫亦有较明显的毒性。

另外,有关蝎毒神经毒素的纯化及初步晶体学研究也已取得了突破性进展。邓君鹏^[7-9]等已得到一系列毒性不同的蝎哺乳动物毒素的晶体,构成一个晶体研究系统,为深入研究蝎神经毒素的结构与功能之间的关系提供了重要的资料。李宏民^[10]用 Sephadex G-50 柱层析法将常德产的蝎毒粗毒进行分离,0.05 mol/L NH_4HCO_3 (pH 8.0) 洗脱,取峰 3 进行 Sephadex C-25 分离, pH 6.0, 0.1 mol/L 的磷

* Address: Wang Yanping, Institute of Natural Materia Medica, Weifang Medical College, Weifang.
王燕平 女, 27 岁, 博士生, 原为山东潍坊医学院心血管药理学硕士, 现在中科院上海药物研究所攻读博士学位, 方向为免疫药理学。

酸缓冲液洗脱,分离出一种 $LD_{50} 2.3 \mu g/g$ 体重的中等毒性的蝎神经毒素 (Bmk5), 分子量为 7 100, HPLC分析有 3个峰,用制备型等电聚焦技术再次纯化,取含量最多的第 2峰 (BmK5-2)经 HPLC分析即为单峰。在此基础上,成功地获得了晶体,测定了部分晶胞参数,收集 0.162 nm 分辨率的衍射数据。他们建立了一个晶体研究系列,为阐明蝎毒产生毒性的分子基础和对蝎毒作为传统中药的机制研究及进一步开发利用 (如基因克隆工程)提供了基本的资料。

2.1.2 昆虫神经毒素: 1994年,吉永华^[11]等又首次直接采用 RP-HPLC对东亚钳蝎粗毒进行分离,并且用两种不同的 HPLC系统反复分离,用 0.1% 三氯醋酸-水和 0.1% 三氯醋酸-70% 乙醇-水进行梯度洗脱,最终获得了 4个软瘫型的昆虫毒素。经聚丙烯酰胺凝胶板状电泳鉴定为一条带,等电点均在 8.3 ~ 8.5之间,均为碱性蛋白;氨基酸组成分析表明这 4个毒素与其它种类的软瘫型昆虫毒素组成相似,均含有较多的 Gly 残基,较少的 Asp 残基,且都含有 1个 Pro 残基。这种作用专一且对昆虫毒性较大的神经毒素的进一步纯化将为开发新型高效的生物杀虫剂提供新的思路。

2.2 膜毒素的分离纯化: 国内外学者通常认为蝎毒的毒性主要是通过影响细胞膜上的钠、钾离子通道而发挥作用,但也有人认为蝎毒可能是通过与细胞膜上的膜脂-膜蛋白相互作用产生其生理与药理作用的,所以,也有人称蝎毒为“膜毒素”。王锦兰^[12]用山东产的马氏钳蝎新鲜粗毒为原料,经 CM-Sephadex G-50和 SP-Sephadex C-25两步层析,得到 3个纯化部分,其毒性最强的 BmK4 $LD_{50} = 0.34 \mu g/g$ 体重,比粗毒提高 40~ 100倍 (粗毒 $LD_{50} 0.34 \mu g/g$ 体重),分子量分别为 6 600, 5 000和 8 500;等电点分别为 8.7, 9.1, 9.1。实验发现,纯化的峰III对人红细胞膜的 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶具有类似乌本苷 (ouabain)的抑制作用, $10^{-6} mg/mL$ 时抑制率可达 25% ~ 40%;纯化的 3个组分还可降低人红细胞膜的流动性,说明蝎毒的毒性作用与其对细胞膜的相互作用有关。但有关“膜毒素”的深入研究还未见报道。

2.3 离子通道毒素的分离纯化: 目前纯化了近百种蝎神经毒素,大多与钠通道作用相关。齐晖^[13]等发现蝎毒粗毒 3.75或 $7.5 \mu g/mL$ 能使小鼠的心肌细胞动作电位的时程与除极有关参数全部减小。因动作电位的时程主要取决于钙离子内流,而除极主要

与钠离子内流有关,所以,蝎毒粗毒对细胞膜离子通道的影响较为复杂,为了探讨是否存在单纯的离子通道作用,杨世杰^[14]等对粗毒进行了二级提取,即用 CM-Sephadex C-50离子交换层析提取得到XIII峰,再经凝胶过滤得第 2峰,经 CM-Sephadex C-10除盐后的提取物XIII-2进行实验,结果显示,峰XIII-2仅仅减小心肌细胞动作电位的除极有关参数,而对动作电位的时程无影响,说明该组分具有单纯阻滞钠通道的作用,这对于开发钠通道阻滞剂的工具药有显著意义。Lebran^[15]等从东亚钳蝎中纯化了 3种新型毒素,分子量在 3 800~ 4 300之间,含 37个氨基酸残基。这 3种毒素均具有钾通道阻断作用。研究发现,与同类相比,这 3种新型毒素中的氨基酸序列发生了多处点突变,对于研究 K^+ 通道的多样性有很大价值。东亚钳蝎有望成为一种新型的研究 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 通道的有利工具。

3 生物活性组分的分离纯化及其药理作用

3.1 镇痛活性肽的分离纯化: 镇痛是全蝎的主要功效,王起振^[16]等采用离子交换层析和凝胶过滤从粗毒中分离出一种镇痛活性肽 SAP, HPLC层析为单一峰,分子量为 9 120,等电点为 7.85,用小鼠醋酸扭体法、小鼠热板法、大鼠光电尾法 3种模型检测其镇痛活性,结果表明: SAP具有较强的镇痛作用。李宁^[17]等研究发现蝎毒的分离组分-A具有明显的中枢镇痛作用,其机制在于蝎毒通过大鼠中脑导水管周围灰质起作用,且镇痛作用较吗啡强 10倍;孔天翰^[18]等改进传统两步柱层析法,采用一步柱层析法,利用 CM-Sephadex C-50超长柱 (长 180 cm,内径 4.5 cm)一次成功地从粗毒中分离纯化了镇痛活性肽 SV4V,临床验证对多种急、慢性疼痛均有较强抑制作用,且具有较好的修复受损神经的功效。蝎毒活性成分的镇痛作用强于吗啡,又无成瘾性,为其独特之优点。如能分离出更纯的镇痛活性肽组分或单体,将是一种很有潜力及应用价值的新型镇痛药。

3.2 抗癫痫肽的分离纯化: 抗癫痫肽 (AEP)是于家琨^[19]等用柱层析法从东亚钳蝎粗毒中纯化而来的,ip有明显的抗癫痫作用, $1.56 \mu mol/kg$ iv,即可明显延长头孢霉素II、马桑内酯引起的大鼠癫痫发作潜伏期,明显抑制青霉素诱发的大鼠癫痫样放电频率,且作用强,用量小,毒性低;同时, AEP还能减少豚鼠离体心脏的收缩力,明显加快心率。另有报道,蝎毒对血压有双相调节作用及抗心动过速的作用。

3.3 抗肿瘤肽的分离纯化: 东亚钳蝎治疗肿瘤有渊

远的历史,全蝎对许多肿瘤有抑制作用。孔天翰^[20]等从粗毒中成功地分离出一种抗癌活性多肽-APB-MV,能高选择性杀伤多种肿瘤细胞,并减轻化疗的骨髓抑制等副作用,提高正常组织的免疫活性,增加抗放化疗辐射能力。

3.4 纤溶活性肽的分离纯化:吕欣然^[21]等通过蝎毒及蝎毒肽能够抑制兔血小板聚集,延长大鼠颈动脉血栓形成的时间,促进大鼠血管内皮细胞释放 PGE₂,以及明显提高大鼠血浆中纤溶酶(PL)的活性和优球蛋白溶解活性(ELT)等一系列实验,得出蝎毒具有纤溶活性的论断,且疗效已在临床得以初步证实;其后,又用 CM-Sephadex C-50进行离子交换层析,透析脱盐后得到纤溶活性较强的组分。实验结果说明,分离成分有明显激活纤溶系统作用,其机制涉及血管内皮细胞释放 PA活性增加;进一步促使纤溶酶原转化为纤溶酶的途径增多,而且能促进内皮细胞释放 PGE₂,改变 TXA₂/PGE₂和 tPA/PAI等功效,再用毛细管电泳技术及蛋白纯化系统进一步分离纯化出 3个峰。实验发现,纯化物有促进内皮细胞更多地释放 tPA,抑制释放 PAI-1或兼而有之等更广泛的纤溶作用^[22]。

4 结语

我国对蝎毒的研究虽然起步较晚,但在科研开

发及其机制研究方面可说是后来者居上。全蝎及其蝎毒毒性成分、活性成分的分离纯化和机制研究和临床应用市场极大,特别是从镇痛、纤溶、抗癌活性成分的分离纯化方面进行深层次的研究、开发和利用,形成高效低毒的新药,扩大临床观察前景远大,势在必行。

参考文献

- 1 周新华.生物化学与生物物理进展,1982,9(4): 25
- 2 周新华.生物化学与生物物理进展,1984,11(2): 20
- 3 吉永华.生命的化学,1996,16(4): 32
- 4 周新华.动物学研究,1983,4(2): 201
- 5 周新华.生物化学与生物物理学报,1988,20(1): 68
- 6 吉永华.生物化学与生物物理学报,1983,15(6): 517
- 7 邓君鹏.生物化学杂志,1996,12(5): 603
- 8 李宏民,等.科学通报,1995,40(8): 746
- 9 金雷,等.科学通报,1993,38: 561
- 10 李宏民.生物化学与生物物理学报,1995,27(2): 145
- 11 Ji Y H, et al. SCI-CHIN A-B, 1994, 37(8): 955
- 12 王锦兰,等.生物化学杂志,1985,1(3): 29
- 13 齐晖,等.中国药理学报,1993,14(4): 361
- 14 杨世杰.白求恩医科大学学报,1994,20(3): 237
- 15 Lebran R K, et al. Biochemistry, 1997, 36(44): 13473
- 16 王起振,等.沈阳药学院学报,1994,11(4): 273
- 17 李宁,等.潍坊医学院学报,1997,19(3): 180
- 18 韩雪飞,等.河南医科大学学报,1996,31(3): 1
- 19 于家琨,等.沈阳药科大学学报,1992,9(3): 200
- 20 董伟华.河南肿瘤学杂志,1994,7(3): 244
- 21 吕欣然,等.基础与临床,1994,14(4): 69
- 22 Lu Xin-ran, et al. XIII th International Congress of Pharmacology, July, 26-31, 1998

(1999-05-10收稿

1999-07-18修回)

大豆异黄酮的研究进展

第二军医大学药学院(上海 200433) 毛峻琴* 宓鹤鸣

摘要 介绍近年来大豆异黄酮的研究进展,包括大豆异黄酮的主要类型、大豆及各种豆制品中异黄酮的含量及其抗肿瘤、防治心血管疾病、抗炎、免疫调节、雌激素作用等多种生物活性。

关键词 大豆 大豆异黄酮 化学结构 药理作用

大豆为豆科植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的成熟种子,是我国和世界许多国家和地区的主要食物品种之一。作为一种功能性食品,公元前 2838 年《神农本草经》首次记载了大豆及其药用价值,并列为“中品”。流行病学调查发现长期食用大豆的东南亚人群中,癌症、心血管等疾病的发生率明显低于西方。近年来研究表明,大豆和豆制品具有广泛的生物功效,如防治癌症、降低血脂、抗动脉粥样硬化症

改善妇女更年期综合征症状、防止鼻出血综合征等,这些功效均与异黄酮密切相关。笔者拟对大豆异黄酮近年来的研究进展作一报道。

1 化学结构

大豆异黄酮是多酚类混合物,大豆异黄酮的组成存在形式主要包括染料木素(金雀异黄素, genistein)^[1]、大豆黄素(daidzein)^[2]和黄豆黄素(glycitein)^[3](图 1)。天然情况下它们大多以β-葡萄

* Address: Mao Junqin, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai

毛峻琴,女,1995年毕业于广州第一军医大学中药大专,1997年起在上海第二军医大学攻读药理学硕士学位。研究课题为“中药淡豆豉的质量标准评价”。